中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）42(3)：245～252（1993）

三島柴胡臺農 1 號之組織培養[1]

許家言　劉新裕　蔡新聲[2]

摘要：本研究之目的在探討三島柴胡臺農1號經由組織培養技術進行大量繁殖的可行性。試驗結果顯示，利用頂芽之繁殖效果較腋芽為優。以1/4量之 Murashige and Skoog（1962）基本鹽類培養基配合 1～2 mg/l Benzyladenine（BA）、0.1 mg/l α-Naphthaleneacetic acid（NAA）、1% sucrose 及0.9%之 Difco-agar（pH 5.7），可促進由頂芽誘生之幼苗體在試管中生長，且有100%之成活率。於培養基中另添加 proline、tryptophan、glutamine 及 asparagine 等氨基酸或椰子汁，不但能促進幼苗體之生長，且能減低幼苗之褐化率。液體培養基之頂芽繁殖率高於固體培養基，添加 1 mg/l BA 之液體培養基在震盪條件下培養頂芽一個月，可有13倍之繁殖效果。

關鍵詞：三島柴胡臺農1號、組織培養、繁殖。

柴胡為繖形科（*Umbelliferae*）柴胡屬（*Bupleurum* L.）之多年生植物，自古以來即為最被重視之常用生藥，『神農本草經』列為上品，『傷寒論』列為少陽病之主藥，供解熱、解毒、消炎、鎮靜用，尤其具有改善肝細胞機能之功效[1,2,3,7]。柴胡屬植物約有100種以上，分佈於北半球，國內目前最常用之柴胡品種有北柴胡（*B. chinense* DC.）、三島柴胡（*B. falcatum* L.）、三島柴胡臺農1號（*B. falcatum* L. cv. Tainung No. 1）及高氏柴胡（*B. kaoi* Liu, Chao, & Chang）四種，品質方面則以後三種較佳[6,18]。

三島柴胡臺農1號為新興之藥用及保健用經濟作物，具有產量穩定、品質優良及適應力強之優點。其種子千粒重為1.23～1.68 g，一般發芽率只20～45%[5]。為期順利進行臺農1號之育苗及栽培生產，篩選新鮮且較大粒種子，並進行4°C之低溫層育處理，將可提高種子之發芽率至69%[4]。此外，新鮮種子活力之維持頗為不易，因此利用組織培養技術，開發由植株之組織或器官大量繁殖之方法[8,10]，誠屬必要。

本研究之目的在探討三島柴胡臺農 1 號利用組織培養繁殖之最適當部位，與培養基中較佳之無機鹽類、植物生長調節劑、蔗糖及其他有機添加物之濃度，期建立三島柴胡臺農 1 號之大量繁殖技術，所得結果將可提供柴胡之育苗與生產利用時之參考。

材料與方法

一、材　料：

三島柴胡臺農 1 號（*Bupleurum falcatum* L. cv. Tainung No. 1）之頂芽及腋芽。

二、方　法：

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1674 號。
2. 本所農藝系助理研究員、研究員、研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

自本所試驗田栽培之三島柴胡臺農1號植株剪下5～6 cm 幼梢，先以0.5%次氯酸鈉（NaOCl）消毒10分鐘，再以無菌水清洗三次後，切取3 mm 長度之頂芽及腋芽進行培養。基本培養基之配方以 Murashige & Skoog (1962) [12]無機鹽類及有機成分爲主，並添加 1 mg/l BA，0.1 mg/l NAA，10% coconut milk，3% sucrose 0.9% Difco-agar（pH 5.7）。培養一個月後分別調查頂芽及腋芽之成活率及褐化情形。綜述本試驗處理之項目及方法如下：

㈠培殖體部位：利用上述基本培養基配方，比較柴胡頂芽及腋芽之成活率。

㈡無機鹽類濃度：探討基本培養基中四組無機鹽類及有機成分濃度對頂芽培養之影響：

1. 全量之無機鹽類及全量之有機成分（代號 B_1）
2. 1/2量之無機鹽類及全量之有機成分（代號 B_2）
3. 1/2量之無機鹽類及1/2量之有機成分（代號 B_3）
4. 1/4量之無機鹽類及全量有機成分（代號 B_4）

㈢BA 濃度：探討基本培養基中三種 BA 濃度（1、2及3 mg/l）之效果。

㈣NAA 濃度：探討基本培養基中三種 NAA 濃度（0.1、0.2及0.4 mg/l）之效果。

㈤Sucrose 濃度：探討基本培養基中四種 sucrose 濃度（1、3、5及7%）之效果。

㈥其他添加物質：於基本培養基中加入下列七組添加物質，探討對頂芽培養之影響：

1. 0.5 mg/l ABA+0.5 mg/l kinetin
2. 500 mg/l casein hydrolysate
3. 2 g/l activated charcoal
4. 10% cocout milk
5. 100 mg/l proline+100 mg/l tryptophan
6. 100 mg/l asparagine+100 mg/l glutamine
7. 不添加組（CK）

㈦pH 値：探討基本培養基中三種 pH（4.7、5.7與6.7）之效果。

㈧培養基態：利用不同 BA 濃度，配合固態或液態培養基，探討對三島柴胡臺農1號芽數增生之影響。基本培養基之配方爲1/4 MS 無機鹽類、全量有機成分、1% sucrose、0.1 mg/l NAA 及10% coconut milk，並配合下列五種處理：

1. 含有1 mg/l BA 及0.9% Difco-agar 之固態培養基。
2. 含有0.5 mg/l BA 之液態培養基。
3. 含有1 mg/l BA 之液態培養基。
4. 含有2 mg/l BA 之液態培養基。
5. 含有4 mg/l BA 之液態培養基。

其中2—5之液體培養條件爲100 rpm 往復式平面振盪培養。

結　　果

一、不同部位培殖體之繁殖效果：

利用基本培養基培養頂芽及腋芽一個月後，頂芽之成活率爲75%，腋芽僅34.6%，差異顯著；而形成 callus 的比率則以腋芽之42.3%顯著較頂芽之25%爲高（表1）。一般而言，在大量繁殖的過程中，callus 的產生較不利於芽體的生長與繁殖，故以上述成活率與形成 callus 之結果推論，利用頂芽作培殖體應較腋芽有利。

表 1. 不同部位培殖體對三島柴胡臺農1號芽體培養之影響

Table 1. Effect of bud positions from field grown plant on the survival rate and callus formation of *B. falcatum* cv. Tainung No.1 bud cultured.

Explant	No. of bud		Survival rate (%)	Callus-forming	
	Cultured	Survived		No.	%
Terminal bud	24	18	75.00 [a*]	6	25.00 [a]
Lateral bud	26	9	34.62 [b]	11	42.31 [b]

* Means followed with the same letter within each column are not significantly different at 1% level by Duncan's multiple range test.

二、不同無機鹽類濃度與有機成分之影響：

表2顯示 B_4 之1/4量無機鹽類與全量有機成分處理組之頂芽培殖成活率最高，達100%，且無褐化現象發生。提高無機鹽類濃度之 B_1、B_2 及 B_3 三種處理成活率反而下降，且褐化率有上升的趨勢。含全量無機鹽類及有機成分之 B_1 處理組，褐化率高達75%；含1/2量無機鹽類及全量有機成分之 B_2 處理組，成活率爲70%，褐化率爲30%，且葉片有褐化現象；含半量無機鹽類及有機成分之 B_3 處理組，其成活率及褐化率與 B_2 處理相同，且植株矮小。由上述結果顯示，有機成分對成活率與褐化現象之影響不若無機鹽類大，但含量不足時則會影響植株之正常生長。而無機鹽類濃度則以1/4量之 MS 培養基爲最適宜，此與 Hiraoka et al. 以1/2量 LS 培養基（Linsmaier & Skoog，1965）進行柴胡分芽繁殖比全量 LS 好的結果相似[10]。

表 2. 不同無機及有機成分對三島柴胡臺農1號芽體培養之影響

Table 2. Effect of inorganic and organic components on the survival rate of *B. falcatum* cv. Tainung No.1 bud cultured.

Treatments	No. of bud		Browning rate (%)	No. of bud survived	Survival rate (%)
	Cultured	Browned			
B_1*	20	15	75 [a]	5	25 [c**]
B_2	20	6	30 [b]	14	70 [b]
B_3	20	6	30 [b]	14	70 [b]
B_4	20	0	0 [c]	20	100 [a]

* Components of B_1, B_2, B_3 and B_4 are described in material and methods.
**Means followed with the same letter within each column are not significantly different at 1% level by Duncan's multiple range test.

三、不同 BA 濃度之影響：

隨著 BA 濃度的提高，頂芽培殖體成活率有下降的現象（表3）。三個 BA 濃度中以1 mg/l 處理的成活率44.1%最高，但其基部 callus 形成的比率亦高達35.3%，此處理組芽之生長高度較其他處理爲佳；2 mg/l BA 處理之成活率爲40.7%，幾與1 mg/l BA 相近，惟有側芽分化及稍有褐化之現象；3 mg/l BA 處理之成活率最低，僅29.4%，其芽體生長矮小，葉捲曲且呈玻璃質化，此外另有不定芽叢生現象。

表 3. 不同 BA 濃度對三島柴胡臺農1號芽體培養之影響

Table 3. Effect of BA concentrations on the survival rate and callus formation of *B. falcatum* cv. Tainung No. 1 bud cultured.

BA (mg/l)	No. of bud		Survival rate (%)	Callus-forming	
	Cultured	Survived		No.	%
1	34	15	44.12 [a***]	12	35.29 [a]
2	27	11	40.74 [a]	3	11.11 [b]
3	34	10	29.41 [ab]	3	8.82 [b]

* Means followed with the same letter within each column are not significantly different at 1% level by Duncan's multiple range test.

四、不同 NAA 濃度之影響：

三種 NAA 濃度處理之成活率介於80～85%，褐化率在15～20%之間，差異皆未達顯著水準（表4），表示就繁殖柴胡頂芽而言，0.1～0.4 mg/l之 NAA 濃度對提高成活率及抑制褐化率之效果差異不大。

表 4. 不同 NAA 濃度對三島柴胡臺農1號芽體培養之影響

Table 4. Effect of NAA concentrations on the survival rate of *B. falcatum* cv. Tainung No. 1 bud cultured.

NAA (mg/l)	No. of bud		Browning rate (%)	No. of bud survived	Survival rate (%)
	Cultured	Browned			
0.1	20	3	15 [a*]	17	85 [a]
0.2	20	3	15 [a]	17	85 [a]
0.4	20	4	20 [a]	16	80 [a]

* Means followed with the same letter within each column are not significantly different at 1% level by Duncan's multiple range test.

五、不同蔗糖濃度之影響：

四個蔗糖濃度處理（1、3、5及7%）中以1%之效果較佳，成活率高達100%，且無褐化現象（表五）；其他三個處理之成活率均爲80%，且有部分褐化，生長較差的情形。此外，蔗糖1%與3%兩處理組之芽體生長較快速，5%與7%兩處理組之芽體則有生長抑制的不良效果。

表 5. 不同蔗糖濃度對三島柴胡臺農1號芽體培養之影響

Table 5. Effect of sucrose concentrations on the survival rate of *B. falcatum* cv. Tainung No. 1 bud cultured.

Sucrose (%)	No. of bud		Browning rate (%)	No. of bud survived	Survival rate (%)
	Cultured	Browned			
1	20	0	0 [b*]	20	100 [a]
3	20	4	20 [a]	16	80 [a]
5	20	4	20 [a]	16	80 [a]
7	20	4	20 [a]	16	80 [a]

* Means followed with the same letter within each column are not significantly different at 1% level by Duncan's multiple range test.

六、不同 pH 值影響：

表6結果顯示，隨著 pH 值的升高，柴胡頂芽成活率逐漸增加，且褐化率逐漸降低。三個處理組中以 pH 6.7之成活率最高達80%，但其植株生長弱小；pH 4.7的成活率最低，僅25%，且褐化情形嚴重。pH 5.7之成活率（60%）介於其中，但植株生長勢最強。故進行三島柴胡臺農1號大量繁殖培養基 pH 之調配，應以5.7較適合。

表 6. 培養基之 pH 對三島柴胡臺農1號芽體培養之影響

Table 6. Effect of pH values on the survival rate of *B. falcatum* cv. Tainung No. 1 bud cultured.

pH	No. of bud		Browning rate (%)	No. of bud survived	Survival rate (%)
	Cultured	Browned			
4.7	20	15	75 [a*]	5	25 [b]
5.7	20	8	40 [b]	12	60 [a]
6.7	20	4	20 [b]	16	80 [a]

* Means followed with the same letter within each column are not significantly different at 1% level by Duncan's multiple range test.

七、不同添加物質之影響：

比較七組添加物質之效果，以0.5 mg/l ABA+0.5 mg/ l Kinetin 組之褐化情形最嚴重，且最早褐化，於培養後20天左右即全部死亡；而500 mg/l casein hydrolysate 處理組芽體生長矮小，芽體基部長出之 callus 形狀最大且數目最多；2 g/l activated charcoal 處理與不加任何添加物質組（CK）之褐化情形相似，顯示添加活性碳並無防止柴胡幼苗褐化的效果；七個處理中以10% coconut milk 與 100mg/l proline+100 mg/l tryptophan 兩處理組之防止褐化效果最佳，100 mg/l asparagine+100 mg/l glutamine 添加組之效果次之。

八、培養基態（phase）之影響：

以表7之五種處理（不同 BA 濃度配合固態或液態培養基），培養三島柴胡臺農1號之頂芽一個月後，固體培養基的芽數仍只有一個，即無新芽的分化或再生現象，而液體培養基的四個處理芽數均在4個以上，顯示液體培養基在芽數的繁殖上顯著優於固體培養基。不同的 BA 濃度處理以 1mg/l BA 之液體培養基可達到最大的繁殖率，一個月可繁殖13個芽（圖1），2mg/l BA 之液體培養基處理次之，有8個芽，而4 mg/l BA 可繁殖4個芽，顯示 BA 濃度不宜過高，以免影響不定芽之形成。

表 7. 不同培養基態及 BA 濃度對柴胡芽數繁殖之影響

Table 7. Effect of medium phases and BA concentrations on formation of new adventitious bud of *B. falcatum* cv. Tainung No.1 bud cultured for one month.

Medium phase	BA (mg/l)	No. of bud formed
Solid	1.0	1 [c*]
Liquid	0.5	6 [b]
Liquid	1.0	13 [a]
Liquid	2.0	8 [b]
Liquid	4.0	4 [bc]

* Means followed by the same letter within the column are not significantly different at 1% level by Duncan's multiple range test.

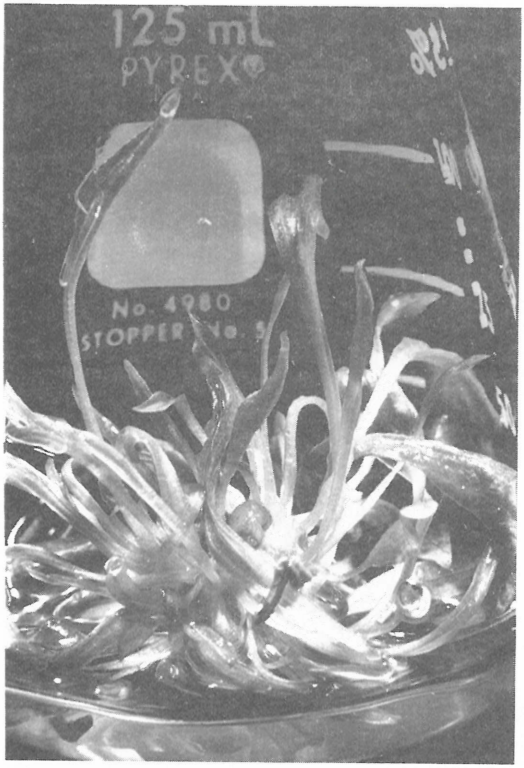

圖 1. 在內含1 mg/l BA 之液體培養基振盪培養1個月後，三島柴胡臺農1號每個頂芽可得13個新芽
Fig. 1. Thirteen buds were induced from terminal bud of *Bupleurum falcatum* L. cv. Tainung No. 1 cultured on liquid medium containing 1 mg/l BA for one month.

討　　論

一般植物利用組織培養技術進行大量繁殖，可分爲固體及液體培養二種方式。George and Sherrington 報導固體培養的優點爲：(一)適合小培殖體的生長及再生，(二)不需要特殊的通氣設備，(三)芽體及根的生長情形較規則，及(四)癒合組織不會散落而成懸浮培養[9]。液體培養雖不如固體培養普遍，但液體培養也可有效的應用於培養癒合組織和器官，且能導致快速的再生。Shoyama et al.指出，以貝母鱗莖爲培殖體大量繁殖時，液體培養之效果遠高於固體培養[14]；Takayama and Misawa 於一系列的微體培養過程中，即以液體培養建立了高速率的植物繁殖法[15]；Kandeel and Hughes 也報導馬鈴薯小芽經液體振盪培養後，有較多的節，而且生長較好[11]。以上報導均再三顯示，液體培養對促進培殖體之生長及分化能力遠較固體培養爲佳，其原因可能爲在液體培養基中，培殖體具有廣大表面積，以吸取和接觸營養成份；另一方面，培殖體所產生的毒性代謝物，也可分散於液體中，而稀釋了毒性。本研究亦顯示，液體培養對柴胡大量繁殖的速率遠高於固體培養，和上述諸學者之結果相當一致。此外，有效的將固體培養基和液體培養基混合使用，常使微體繁殖法得到裴然的成果；例如先於固體培養中誘導出嫩芽，然後移至液體培養基中，可使芽體快速發育。Shoyama et al. 以液體振盪法培殖半夏（*Pinellia ternata*），由取得一個球莖的組織團塊，理論上一年後可繁殖出4×10^{23}個以上的植株[13]。而 Tsay et al. 以固體培養基與液體培養基交互應用，可使培殖體維持旺盛的繁殖力，由一株芽估計一年可得2×10^{27}株之幼苗[17]。Takayama and Misawa 亦報導先將百合（*Lilium auratum* L. *longiflorun* 及 L. *Speciosum*）的鱗片組織於固體培養基中誘導出鱗片

子葉，再移至液體培養中，可得到令人滿意之繁殖速率[16]。本研究亦發現，先將柴胡之頂芽（3mm）培養於固體培養基，待其成活及生長健壯後，再繼代培養於含有1 mg/l BA 之液體培養基中，可誘導大量芽體產生，對柴胡之大量繁殖最爲有利。

綜述本研究之結果如下：利用組織培養技術進行三島柴胡臺農1號大量繁殖的過程中，褐化及繁殖速率緩慢是兩大瓶頸。利用頂芽之成活率高於腋芽。使用液體振盪培養方式，並在培養基中加入1 mg/l BA、100 mg/l proline 及100 mg/l tryptophan 等氨基酸，或10% coconut milk，其繁殖倍率最佳。

誌　謝

本研究承蒙行政院農業委員會補助經費（78農建－7.1糧－49），試驗進行期間承蒙紀科衡先生與林淑如小姐之協助，謹致謝意。

引用文獻

1. 中藥大辭典編輯委員會。1981。柴胡。中藥大辭典第三册。臺中市昭人出版社。pp.2816－2825。
2. 中藥典編輯委員會。1985。柴胡。中華民國中藥典範第一輯第一册。行政院衛生署。pp.43－46。
3. 林俊清。1990。生藥柴胡與柴胡劑。高雄醫學院。高雄市。pp.1－87。
4. 劉新裕。1988。不同海拔地區對三島柴胡生育性狀、產量及有效成分 saponin 含量之影響。中華農業研究37：396－404。
5. 劉新裕、徐原田、胡敏夫、邱善美。1989。三島柴胡臺農1號之育成。中華農業研究38：326－334。
6. 劉新裕、王昭月、李肇昌、李春越。1991。三島柴胡臺農1號適應能力及其有效利用部位之開發研究。中華農業研究40：28－36。
7. 賴榮祥。1976。柴胡。原色生藥學。臺中市創譯出版社。pp.81－85。
8. Amano, A., K. Fujimoto, H. Ohashi, K. Matsunaga and H. Mizukami.1989. Chromosome number variation in *Bupleurum falcatum* plants regenerated through somatic embryogenesis of callus cultures. Shoyakugaku Zasshi 43：13－18. (in Japanese)
9. George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture : Handbook and dictionary of commercial laboratories. (ed. by E. F. George and P. D. Sherrington) . Eastern Press Reading, Berks, England. pp. 125－330.
10. Hiraoka, N., T. Kodama and Y. Tomita. 1983. In vitro propagation of *Bupleurum falcatum.* Shoyakugaku Zasshi 37：62－67. (in Japanese)
11. Kandeel, N. and H. Hughes. 1988. Delayed effects shake culture. Agricell Rep. 11：22.
12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15：473－497.
13. Shoyama, Y., K. Hatano and I. Nishioka. 1983. Clonal multiplication of *Pinellia ternata* by tissue culture. Plant Medica 49：14－16.
14. Shoyama, Y., N. Hasegawa and I. Nishioka. 1986. Studies on propagation of *Fritillaria verticillata* tissue (1) . Jap. J. Pharmacognosy 40：198－202.
15. Takayama, S. and M. Misawa. 1981. Mass propagation of Begonia x Hiemalis plantlets by shake culture. Plant Cell Physiol. 22：461－467.
16. Takayama, S. and M. Misawa.1982. Factors affecting differentiation and growth in vitro and a mass-propagation scheme for Begonia x Hiemalis. Scient. Hort. 16：65－75.
17. Tsay, H. S., T. G. Gau and C. C. Chen. 1989. Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by tissue culture. Plant Cell Rep. 8：450－454.
18. Yen, M. H., C. C. Lin, C. H. Chuang, and S. Y. Liu. 1991. Evaluation of root quality of *Bupleurum* species by TLC scanner and the liver protective effects of "Xiao-chai-hu-tang" prepared using three different *Bupleurum* species. J. Ethnopharmacology 34：155－165.

Studies on Tissue Culture of *Bupleurum falcatum* L. cv. Tainung No. 1.[1]

Jia-Yan Hsu, Sin-Yie Y. Liu and Hsin-Sheng Tsay[2]

Summary

The purpose of this study was to develop an effective method for mass propagation of *Bupleurum falcatum* L. cv. Tainung No.1 through tissue culture techniques. The effectiveness of various explant parts and medium composition were investigated. Experimental results showed that the terminal bud (3mm in length) possessed a higher survival rate than lateral bud. For medium composition, 1/4 strength of MS (1962) inorganic salts with full strength of organic constituents, supplemented with 1 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA, 1% sucrose and 0.9% Difco agar (pH 5.7) were ideal for the in vitro growth of shoot tips. Survival rate as high as 100% was recorded.

Addition of amino acids, e. g., proline, tryptophan, and asparagine, or coconut milk to the culture medium could facilitate shoot growth as well as delay the occurrence of tissue browning.

The propagation rate was higher in liquid culture than in solid medium. Thirteen adventitious buds could be produced from a single apex bud cultured in liquid medium and shaken at 100 rpm within one month.

Key words : *Bupleurum falcatum* L. cv. Tainung No. 1, Tissue culture, Propagation.

---

1. Contribution No. 1674 from Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported by a grant (78農建—7.1糧—49) from the Council of Agriculture, Executive Yuan, ROC. and assisted by Mr. K. H. Chi and Miss. S. R. Lin.
2. Assistant Agronomist, and Senior Agronomists, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan 413, ROC.